

**Table S1** Matrix of pairwise genetic distances (*p*-distance in 1<sup>st</sup> line) based on alignment of ITS regions (848 bp) and number of variable nucleotides (2<sup>nd</sup> line), including *Gyrodactylus* species investigated in this study (in **bold**) and their closest hits revealed by nBLAST search, listed in Table 2 (below diagonal) and based on newly-generated sequences (1016 bp long) of *Gyrodactylus* species (above diagonal). H1 = *L. chryscephalus*; H2 = *S. atromaculatus*; H3 = *N. hudsonius*; L1 =Morrys Creek (Wisconsin); L2 =Oaks Creek (New York); L3 =Mink River (Wisconsin) (see Table 1 for fish sampling details).

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)	(16)	(17)	(18)	(19)	(20)	(21)	(22)	(23)	(24)	(25)	(26)	(27)	(28)	(29)
(1) <i>G. atratuli</i>		0.022 20		0.169 154	0.312 263	0.124 114	0.028 26	0.025 23	0.340 289	0.337 287	0.324 277	0.155 140	0.103 94	0.097 89	0.098 90	0.098 284	0.092 84	0.150 136	0.140 127	0.018 17	0.021 19	0.017 16	0.135 122	0.128 116		0.026 24	0.141 129		
(2) <i>G. colemanensis</i>	0.021 17		0.170 155	0.314 265	0.138 127	0.043 37	0.040 287	0.336 285	0.334 277	0.324 141	0.107 98	0.105 96	0.106 97	0.108 99	0.329 282	0.098 90	0.148 134	0.142 129	0.036 33	0.034 31	0.030 28	0.142 129	0.133 121		0.041 38	0.152 140			
(3) <i>G. colemanensis</i> <sup>1</sup>	0.018 15	0.004 3																											
(4) <i>G. dectiari</i>	0.152 122	0.150 121	0.153 123		0.342 289	0.184 176	0.170 155	0.171 156	0.350 297	0.349 296	0.347 297	0.199 181	0.163 153	0.177 165	0.177 164	0.181 169	0.345 295	0.163 150	0.199 178	0.194 151	0.166 150	0.165 149	0.164 169	0.185 151		0.169 154	0.201 192		
(5) <i>G. ellae</i> sp. nov.	0.293 221	0.289 219	0.292 221	0.311 234		0.322 273	0.314 265	0.316 266	0.161 136	0.166 141	0.064 55	0.340 287	0.325 275	0.324 274	0.323 273	0.078 67	0.307 258	0.326 275	0.327 274	0.312 263	0.310 261	0.310 261	0.315 265	0.319 268		0.316 266	0.334 283		
(6) <i>G. hamidii</i> sp. nov.	0.085 69	0.097 79	0.100 81	0.149 119	0.297 224		0.138 126	0.133 122	0.354 302	0.354 302	0.341 293	0.186 168	0.137 129	0.149 139	0.150 140	0.145 135	0.343 294	0.155 143	0.173 157	0.181 164	0.128 117	0.129 118	0.127 116	0.169 155	0.153 153		0.134 123	0.026 25	
(7) <i>G. hansenii</i> sp. nov. -H1	0.017 14	0.029 24	0.029 24	0.149 224	0.296 78		0.096 5	0.005 287	0.337 286	0.336 277	0.324 142	0.157 95	0.104 97	0.106 98	0.107 98	0.334 285	0.098 90	0.158 143	0.146 133	0.024 22	0.025 23	0.024 22	0.143 130	0.128 124		0.013 12	0.154 141		
(8) <i>G. hansenii</i> sp. nov. -H2	0.013 11	0.026 21	0.026 21	0.156 224	0.296 74	0.091 5	0.006 287	0.337 285	0.335 278	0.326 153	0.101 92	0.103 94	0.104 95	0.104 95	0.335 286	0.095 87	0.153 139	0.142 129	0.021 19	0.022 20	0.021 19	0.139 126	0.132 120		0.010 9	0.149 137			
(9) <i>G. huysae</i> sp. nov. -H1	0.321 242	0.312 236	0.314 238	0.330 248	0.164 125	0.332 251	0.321 243	0.320 242		0.013 11	0.151 130	0.355 301	0.345 294	0.343 293	0.342 292	0.346 296	0.163 140	0.322 282	0.347 294	0.341 288	0.338 286	0.336 286	0.337 287	0.335 284		0.338 288	0.364 311		
(10) <i>G. huysae</i> sp. nov. -H3	0.321 242	0.312 236	0.314 238	0.332 249	0.168 128	0.334 252	0.323 244	0.320 242	0.010 8		0.154 132	0.356 302	0.344 293	0.342 292	0.341 291	0.345 295	0.162 139	0.332 282	0.347 294	0.341 288	0.336 285	0.336 285	0.335 286	0.333 284		0.336 286	0.363 310		
(11) <i>G. kuchtai</i> sp. nov.	0.301 228	0.298 226	0.300 228	0.322 243	0.058 44	0.316 231	0.305 231	0.305 231	0.152 116	0.158 120		0.349 297	0.335 287	0.333 285	0.334 284	0.334 284	0.327 286	0.340 286	0.334 283	0.323 276	0.321 274	0.325 274	0.324 275		0.327 279	0.354 304			
(12) <i>G. lummei</i> sp. nov.	0.131 106	0.130 105	0.132 107	0.171 137	0.313 236	0.154 124	0.135 109	0.130 105	0.341 257	0.341 257	0.322 243		0.152 137	0.153 138	0.157 142	0.144 129	0.343 292	0.144 130	0.155 132	0.155 107	0.155 138	0.155 140	0.155 100	0.106 97		0.155 140	0.203 184		
(13) <i>G. mendelensis</i> sp. nov.	0.075 61	0.079 64	0.081 66	0.149 119	0.313 236	0.087 71	0.084 68	0.080 65	0.322 251	0.322 251	0.321 243	0.140 113		0.131 122	0.132 123	0.134 125	0.134 125	0.340 291	0.127 117	0.133 133	0.133 88	0.135 92	0.135 91	0.135 123		0.103 94	0.154 145		
(14) <i>G. prikrylovae</i> sp. nov.	0.074 60	0.081 66	0.082 67	0.153 124	0.310 235	0.103 84	0.081 66	0.077 63	0.328 249	0.328 249	0.314 239	0.138 112	0.095 77		0.001 1	0.016 15	0.338 289	0.070 65	0.148 134	0.145 132	0.097 89	0.098 90	0.098 90	0.145 125		0.104 95	0.165 154		
(15) <i>G. prikrylovae</i> sp. nov. -L1	0.074 60	0.083 68	0.082 67	0.153 124	0.311 236	0.106 86	0.083 68	0.080 65	0.329 250	0.329 250	0.315 240	0.139 113	0.097 79	0.002 2		0.017 15	0.337 288	0.070 65	0.147 133	0.146 132	0.099 90	0.099 91	0.099 91	0.138 125		0.105 96	0.166 155		
(16) <i>G. scholzi</i> sp. nov.	0.072 59	0.082 67	0.083 68	0.153 124	0.308 234	0.101 82	0.080 65	0.076 62	0.327 248	0.327 248	0.313 242	0.139 113	0.091 74	0.006 5	0.009 7		0.341 292	0.076 71	0.148 134	0.150 136	0.098 90	0.098 91	0.098 91	0.143 130		0.105 96	0.159 149		
(17) <i>G.</i> sp. 'C. neogaeus'	0.306 232	0.303 230	0.306 232	0.313 236	0.071 54	0.314 238	0.310 235	0.310 235	0.160 122	0.160 122	0.056 43	0.319 241	0.324 241	0.317 242	0.315 240		0.327 278	0.334 284	0.335 284	0.333 284	0.330 282	0.330 282	0.326 282		0.337 288	0.351 301			
(18) <i>G.</i> sp. 'H. nuchalis'	0.075 61	0.081 66	0.082 67	0.148 119	0.289 219	0.109 88	0.081 66	0.077 63	0.324 245	0.324 245	0.311 236	0.128 104	0.099 80	0.056 46	0.059 48	0.057 47		0.136 123	0.135 83	0.147 85	0.145 115	0.093 119	0.093 119	0.093 119		0.094 86	0.171 158		
(19) <i>G.</i> sp. 1 'C. spadiceum'	0.128 104	0.123 100	0.126 102	0.173 139	0.304 229	0.141 114	0.135 110	0.130 106	0.337 254	0.337 254	0.320 242	0.135 110	0.136 111	0.131 107	0.131 107	0.317 240	0.127 103		0.106 97	0.149 135	0.152 137	0.151 138	0.091 83		0.155 141	0.192 174			
(20) <i>G.</i> sp. 2 'C. spadiceum'	0.126 102	0.126 102	0.128 104	0.164 133	0.309 233	0.150 121	0.131 106	0.126 102	0.332 251	0.332 251	0.320 242	0.130 106	0.131 106	0.129 107	0.129 105	0.317 240	0.119 97	0.092 75		0.141 128	0.139 126	0.139 126	0.080 68		0.142 141	0.196 196			
(21) <i>G.</i> sp. 1 'R. atratulus'	0.010 8	0.024 20	0.023 19	0.152 224	0.296 224	0.086 70	0.021 17	0.017 14	0.322 244	0.322 244	0.303 231	0.130 105	0.074 60	0.071 59	0.074 61	0.074 59	0.322 235	0.127 103	0.127 103	0.127 103	0.074 60	0.127 115		0.022 115	0.144 115				
(22) <i>G.</i> sp. 2 'R. atratulus' -L2	0.011 9	0.021 17	0.021 17	0.149 220	0.291 220	0.087 71	0.021 17	0.017 14	0.320 242	0.320 242	0.301 228	0.133 108	0.079 64	0.077 61	0.079 63	0.079 60	0.306 231	0.127 105	0.127 105	0.127 105	0.074 60	0.127 120		0.023 21	0.132 132				
(23) <i>G.</i> sp. 2 'R. atratulus' -L3	0.010 8	0.020 16	0.020 16	0.149 220	0.291 220	0.086 70	0.020 16	0.016 13	0.321 243	0.321 243	0.301 233	0.132 105	0.077 65	0.076 62	0.078 64	0.075 63	0.323 232	0.127 105	0.127 105	0.127 105	0.074 62	0.127 131		0.022 20	0.142 130				
(24) <i>G. spatulatus</i>	0.114 92	0.120 97	0.122 126	0.156 224	0.297 224	0.137 111	0.120 97	0.115 93	0.322 243	0.322 243	0.309 234	0.124 75	0.092 100	0.124 101	0.124 101	0.309 234	0.118 96	0.078 63	0.078 61	0.124 91	0.116 94	0.117 95	0.034 32		0.138 125	0.187 170			
(25) <i>G. stunkardi</i>	0.109 88	0.112 91	0.115 93	0.156 126	0.297 224	0.135 109	0.115 93	0.110 89	0.322 243	0.322 243	0.308 233	0.125 75	0.092 102	0.125 103	0.125 103	0.306 232	0.118 96	0.073 59	0.073 56	0.124 87	0.112 91	0.113 92	0.026 21		0.131 119	0.183 166			
(26) <i>Gyrodactylus</i> sp. <sup>2</sup>	0.015 12	0.027 22	0.027 22	0.153 123	0.299 226	0.092 75	0.112 10	0.107 7	0.323 244	0.323 244	0.307 233	0.130 105	0.080 65	0.076 62	0.078 64	0.075 63	0.323 232	0.126 96	0.076 59	0.076 56	0.124 87	0.112 91	0.113 92	0.026 21		0.131 132	0.192 174		
(27) <i>Gyrodactylus</i> sp. <sup>3</sup>	0.105 84	0.109 88	0.111 89	0.156 125	0.303 227	0.135 108	0.101 8	0.066 5	0.326 244	0.326 244	0.312 234	0.124 74	0.092 100	0.124 97	0.124 100	0.313 235</													